

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 365 430**

21 Número de solicitud: 201030417

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **23.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.10.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Sampedro Quesada, Inmaculada;**
Aranda Ballesteros, Elisabeth;
Díaz Rodríguez, Rosario;
Siles, José Antonio;
García Sánchez, Mercedes;
García Romera, Inmaculada y
Ocampo Bote, Juan Antonio

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método para el incremento de la producción de lacasa en *Corioloopsis* mediante un inductor biológico.**

57 Resumen:

Método para el incremento de la producción de lacasa en *Corioloopsis* mediante un inductor biológico.

La invención se refiere a un método de producción incrementada de la enzima lacasa en un organismo del género *Corioloopsis*, el cual comprende co-cultivar dicho organismo con uno del género *Penicillium*. Este método adicionalmente puede incluir la purificación de la lacasa.

ES 2 365 430 A1

DESCRIPCIÓN

Método para el incremento de la producción de lacasa en *Corioloopsis* mediante un inductor biológico.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología, y específicamente, se refiere a un método para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Corioloopsis*, que comprende co-cultivar dicho organismo junto con otro organismo del género *Penicillium*.

Estado de la técnica anterior

10 Las lacasas son enzimas de tipo fenoloxidasas que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos y ligninas. Debido a esta capacidad de oxidación, estas enzimas son ampliamente utilizadas en diferentes industrias como la cosmética, alimentaria, textil, e incluso en campos como la bioelectroquímica o la nanotecnología.

15 Por otro lado, debido a su capacidad de degradar compuestos aromáticos, esta enzima también es utilizada en la degradación de pesticidas y compuestos xenobióticos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, o en la biorremediación de residuos agroindustriales.

20 Estas lacasas, presentan una baja especificidad de sustrato, y su eficacia catalítica varía mucho en función de la presencia o ausencia de inductores de la misma, así como de la naturaleza de los mismos. Para el uso de estas enzimas, a nivel industrial, es necesaria una alta actividad enzimática. Para aumentar esta actividad enzimática se han utilizado de forma generalizada microelementos como por ejemplo el cobre u otros inductores químicos como por ejemplo el alcohol veratrílico, vainillina, alcalignina o ácido vanílico. Estos inductores presentan como ventaja el incremento significativo de los niveles de lacasa, pero su uso industrial supone diversos problemas como el alto coste de dichos compuestos por las elevadas cantidades necesarias, o la posible toxicidad de los mismos en los productos finales.

Por ello se hace necesaria la búsqueda de elementos alternativos a esos inductores químicos y microelementos.

30 Para tratar de aumentar la producción se han tratado de utilizar cultivos de organismos como por ejemplo el hongo *Trametes sp* (Xiao *et al.* 2003, *Appl. Microbiol. Biot.*, 60: 700-707) o *Corioloopsis rigida*. Estos organismos se ha demostrado que presentan altas producciones de lacasa. A pesar de ello, para obtener niveles adecuados de producción, es necesario además, añadir a los cultivos de estos microorganismos inductores químicos como por ejemplo metales pesados como el cobre, la lignina kraft o mezclas de fenoles. Este método presenta los mismos inconvenientes como son los elevados costes y la posible contaminación por parte de estos productos.

35 Para salvar estas deficiencias se han utilizado otras aproximaciones como por ejemplo el uso de salvado de cebada como sustrato para los microorganismos además de cobre para de esta forma reducir las cantidades necesarias, y aumentar la producción (Gómez *et al.* 2006, *Biotechnol Lett.* 28: 1013-1017).

40 Aún mediante esta aproximación las producciones son inferiores a las deseadas por lo que siguen siendo necesarias otras aproximaciones para la elevada producción de lacasas. Esto ha llevado al estudio de inducciones biológicas de la producción de lacasas en diversos organismos. De esta forma, se han estudiado por ejemplo la inducción de la producción de lacasa mediante el co-cultivo con *Trichoderma* tanto en *Pleurotus ostreatus* (Velázquez-Cedaño *et al.*, 2004, *Mycologia*. 96: 712-719) como en *Trametes sp* (Zhang *et al.*, 2006, *Appl Microbiol Biot.* 73: 89-94). A pesar de ello, aun sigue siendo necesario la mejora de la producción de lacasa ya que los niveles de producción alcanzados no son los deseados para la producción industrial.

45 Por tanto, resulta necesario encontrar nuevos sistemas que permitan obtener mayores cantidades de la enzima lacasa, que no necesiten de inductores químicos, ya que pueden producir contaminaciones en los productos, y que elevan el coste de producción.

Descripción de la invención

55 La presente invención refiere a un método para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Corioloopsis* mediante el co-cultivo con un organismo del género *Penicillium*.

60 En la presente invención se demuestra como el co-cultivo de *Corioloopsis* junto a un hongo del género *Penicillium*, provoca un aumento de la producción de *Corioloopsis* frente al cultivo en un medio completo. Este método también presenta ventajas frente a la inducción habitual en la producción de estas enzimas como, por ejemplo, la no necesidad de utilizar compuestos químicos, y que la inducción es mayor mediante este método que mediante el uso de inductores ampliamente utilizados, como muestras fenólicas o cobre. En la presente invención se observa que este incremento es de unas 3000 veces sobre el cultivo basal de *Corioloopsis*, unas 150 veces sobre la inducción con una mezcla fenólica, y de más del doble frente a la adición de cobre.

65 Por todo ello un primer aspecto de la invención se refiere a un método (de ahora en adelante método de la invención) para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Corioloopsis*, que comprende co-cultivar dicho organismo junto con otro organismo del género *Penicillium*.

ES 2 365 430 A1

En la presente invención se entiende por “co-cultivo” o “co-cultivar” aquel proceso mediante el cual se hacen crecer juntas en un mismo medio de cultivo, dos o más tipos celulares. En la presente invención el co-cultivo se realiza mediante la mezcla de células procedentes de dos hongos diferentes, uno del género *Corioloopsis*, y otro del género *Penicillium*.

5

Los organismos del género *Corioloopsis*, pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Basidiomycota*, Clase *Agaricomycetes*, Orden *Polyporales*, Familia *Coriolaceae*.

10

Los organismos del género *Penicillium* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Fungi*, Subreino *Dikarya*, Phylum *Ascomycota*, Subphylum *Pezizomycotina*, Clase *Eurotiomycetes*, Orden *Eurotiales*, Familia *Trichocomaceae*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el método de la invención comprende los pasos:

15

- a) cultivar un organismo del género *Corioloopsis*
- b) añadir al cultivo del paso a) un organismo del género *Penicillium*, y
- c) co-cultivar los 2 organismos.

20

25

Para la realización del método de la invención, los pasos (a) y (b) pueden ser llevados a cabo de forma simultánea o secuencial, es decir, se puede llevar a cabo un cultivo del organismo del género *Corioloopsis* y tras un tiempo de crecimiento añadir el organismo del género *Penicillium* y llevar a cabo el co-cultivo, o bien se puede añadir el organismo del género *Penicillium* en el mismo momento de inocular el organismo del género *Corioloopsis* y por tanto llevar a cabo el co-cultivo desde el primer instante de crecimiento. En la presente invención se demuestra que la adición del género *Penicillium* 3 días después de empezar el cultivo del organismo del género *Corioloopsis* produce una mejora en la producción de actividad lacasa. Por ello, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, en el paso (b), el organismo del género *Penicillium* se añade 3 días después de iniciar el cultivo del paso (a).

30

35

En la presente invención también se demuestra que la adición de un organismo del género *Penicillium* 6 días después de empezar el cultivo del organismo del género *Corioloopsis* produce una mejora adicional en la producción de actividad lacasa. Por ello en otra realización más preferida de este aspecto de la invención, en el paso (b), el organismo del género *Penicillium* se añade 6 días después de iniciar el cultivo del paso (a).

40

45

Tanto el cultivo de los organismos de los géneros *Corioloopsis* y *Penicillium* como el co-cultivo pueden ser llevados a cabo en multitud de medios diferentes que son ampliamente utilizados para el crecimiento de hongos, y que son conocidos por experto en la materia, como por ejemplo, aunque sin limitarse, CMA, Czapek, MA, MEA, MB, PCA, PDA, PDB, PDYA, Sabouraud o XH descritos en Collins and Lyne's *Microbiological Methods*, 1995, Butterworth-Heinemann; Hawksworth and Kirsop, 1988, Cambridge University Press.

50

55

Por otro lado, debido a la alta resistencia de los hongos, el co-cultivo de ambos organismos se puede llevar a cabo en diferentes condiciones de temperatura sin que afecte a las características del mismo. Por tanto, el co-cultivo se puede realizar a temperaturas como por ejemplo, aunque sin limitarse, de entre 15° y 35°C. En una realización preferida, el co-cultivo se lleva a cabo a una temperatura de entre 20° y 30°C. En una realización más preferida el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 28°C.

60

65

En la presente invención se muestra que el co-cultivo de los hongos se puede llevar a cabo tanto en condiciones estáticas como en agitación, dándose en ambos casos inducción de la producción de actividad lacasa. En los ejemplos se observa que la inducción es mayor cuando el co-cultivo se lleva a cabo en condiciones estáticas. Por ello en una realización más preferida el co-cultivo del paso (c) se lleva a cabo en condiciones estáticas.

70

75

Se entiende por “condiciones estáticas” en la presente invención, aquel cultivo que se lleva a cabo en reposo, es decir que no se encuentra sometido a agitación en ningún momento durante el desarrollo del cultivo.

80

En los ejemplos de la presente invención se demuestra que la actividad lacasa, presente en el co-cultivo se va incrementando a lo largo del tiempo, al menos hasta el día 21. Por ello, en una realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el co-cultivo de los 2 organismos se lleva a cabo durante al menos 12 días.

85

En otra realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el co-cultivo de los 2 organismos se lleva a cabo durante al menos 18 días.

90

En otra realización aun más preferida de este aspecto de la invención, el co-cultivo de los 2 organismos se lleva a cabo durante al menos 21 días.

95

Resulta deseable, aparte del incremento de la actividad lacasa en el co-cultivo, el poder purificar la lacasa para poder utilizarla en cualquier proceso industrial. Dicha lacasa es recuperable desde el co-cultivo utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica, y ampliamente utilizados como por ejemplo, aunque sin limitarse, isoelectroen-

foque, cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de intercambio aniónico. Por todo ello, cualquiera de los métodos de la invención pueden incluir adicionalmente un paso (d) que consiste en la purificación de la lacasa.

5 Dentro del género *Corioloopsis* existen diversas especies que pueden ser útiles para la producción de lacasas. Este género incluye por ejemplo, aunque sin limitarnos, *Corioloopsis aspera*, *Corioloopsis byrsina*, *Corioloopsis caperata*, *Corioloopsis gallica*, *Corioloopsis polyzona*, *Corioloopsis rigida* o *Corioloopsis sanguinaria*. Por todo ello, en otra realización preferida del método de la invención, el organismo del género *Corioloopsis* se selecciona de la lista que comprende *Corioloopsis aspera*, *Corioloopsis byrsina*, *Corioloopsis caperata*, *Corioloopsis gallica*, *Corioloopsis polyzona*, *Corioloopsis rigida* o *Corioloopsis sanguinaria*. En una realización más preferida el organismo del género *Corioloopsis* es *Corioloopsis rigida*.
10

Por su parte, el género *Penicillium* es uno de los géneros más estudiados y por tanto es uno de los géneros que mayor número de especies presenta. Así, este género incluye por ejemplo, aunque sin limitarse, las especies *Penicillium aculeatum*, *Penicillium adametzii*, *Penicillium adametzioides*, *Penicillium aethiopicum*, *Penicillium albocoremium*, *Penicillium alicantinum*, *Penicillium allii*, *Penicillium amagasakiense*, *Penicillium angulare*, *Penicillium antarcticum*, *Penicillium arenicola*, *Penicillium argillaceum*, *Penicillium asperosporum*, *Penicillium atramentosum*, *Penicillium atroveneretum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium aurantiovirens*, *Penicillium bialowiezense*, *Penicillium biforme*, *Penicillium bilaiae*, *Penicillium biourgeianum*, *Penicillium boreae*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium brevissimum*, *Penicillium brevistipitatum*, *Penicillium brocae*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium canariense*, *Penicillium canescens*, *Penicillium capsulatum*, *Penicillium carneum*, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium cavernicola*, *Penicillium cecidicola*, *Penicillium charlesii*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium chrysogenum complex*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium chrszaszczii*, *Penicillium cieglerei*, *Penicillium cinerascens*, *Penicillium cinnamopurpureum*, *Penicillium citreonigrum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium citrioviride*, *Penicillium clavigerum*, *Penicillium coffeae*, *Penicillium commune*, *Penicillium concentricum*, *Penicillium confertum*, *Penicillium coprobium*, *Penicillium coprophilum*, *Penicillium coralligerum*, *Penicillium cordubense*, *Penicillium corylophilum*, *Penicillium crateriforme*, *Penicillium cremeogriseum*, *Penicillium crocicola*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium cyaneum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium daleae*, *Penicillium decaturense*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium dendriticum*, *Penicillium dierckxii*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium dimorphosporum*, *Penicillium dipodomycicola*, *Penicillium dipodomyis*, *Penicillium discolor*, *Penicillium diversum*, *Penicillium donkii*, *Penicillium dravuni*, *Penicillium duclauxii*, *Penicillium echinulatum*, *Penicillium ellipsoideosporum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium fagi*, *Penicillium farinosum*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium flavigenum*, *Penicillium formosanum*, *Penicillium frei*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium fuscoglaucum*, *Penicillium fuscum*, *Penicillium georgiense*, *Penicillium gerundense*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium gladioli*, *Penicillium glandicola*, *Penicillium granulatum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium griseolum*, *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium herquei*, *Penicillium heteromorphum*, *Penicillium hirsutum*, *Penicillium hordei*, *Penicillium ianthinellum*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium indicum*, *Penicillium inflatum*, *Penicillium isariiforme*, *Penicillium islandicum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium jamesonlandense*, *Penicillium janczewski*, *Penicillium janczewskii*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium jensenii*, *Penicillium kojigenum*, *Penicillium kurssanovii*, *Penicillium lagena*, *Penicillium lanosum*, *Penicillium lilacinoechinulatum*, *Penicillium lividum*, *Penicillium macrosclerotiorum*, *Penicillium madriti*, *Penicillium malacaense*, *Penicillium mali*, *Penicillium manginii*, *Penicillium marinum*, *Penicillium marneffeii*, *Penicillium megasporum*, *Penicillium melanoconidium*, *Penicillium meleagrinum*, *Penicillium melinii*, *Penicillium miczynskii*, *Penicillium minioluteum*, *Penicillium mononematosum*, *Penicillium montanense*, *Penicillium multicolor*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium namyslowskii*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium novae-zeelandiae*, *Penicillium oblatum*, *Penicillium occitanis*, *Penicillium ochrochloron*, *Penicillium olsonii*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium palitans*, *Penicillium palmense*, *Penicillium paneum*, *Penicillium paraherquei*, *Penicillium parvulum*, *Penicillium paxilli*, *Penicillium persicinum*, *Penicillium phialosporum*, *Penicillium phoeniceum*, *Penicillium piceum*, *Penicillium pimiteouiense*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium piscarium*, *Penicillium pittii*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium pullum*, *Penicillium pulvillorum*, *Penicillium punicea*, *Penicillium purpurascens*, *Penicillium purpurogenum*, *Penicillium pusillum*, *Penicillium quercetorum*, *Penicillium raciborskii*, *Penicillium radicola*, *Penicillium radicum*, *Penicillium raistrickii*, *Penicillium ramusculum*, *Penicillium raperi*, *Penicillium resedanum*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium ribeum*, *Penicillium rivolii*, *Penicillium rolfsii*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium roseopurpureum*, *Penicillium rubrisclerotium*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium sabulosum*, *Penicillium sartoryi*, *Penicillium scabrosum*, *Penicillium sclerotigenum*, *Penicillium sclerotiorum*, *Penicillium shennongjianum*, *Penicillium siamense*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium skrjabinii*, *Penicillium solitum*, *Penicillium soppii*, *Penicillium spinulosum*, *Penicillium steckii*, *Penicillium striatisporum*, *Penicillium subarcticum*, *Penicillium sublateritium*, *Penicillium sumatrense*, *Penicillium swiecickii*, *Penicillium syriacum*, *Penicillium tardum*, *Penicillium terrestre*, *Penicillium thiersii*, *Penicillium thomii*, *Penicillium thymicola*, *Penicillium toxicarium*, *Penicillium tricolor*, *Penicillium tulipae*, *Penicillium turbatum*, *Penicillium ulaiense*, *Penicillium urticae*, *Penicillium variabile*, *Penicillium velutinum*, *Penicillium venetum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium verruculosum*, *Penicillium vinaceum*, *Penicillium virgatum*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium vulpinum*, *Penicillium waksmanii*, o *Penicillium westlingii*. Por todo ello, en una realización preferida del método de la invención, el organismo del género *Penicillium* se selecciona de la lista que comprende *Penicillium aculeatum*, *Penicillium adametzii*, *Penicillium adametzioides*, *Penicillium aethiopicum*, *Penicillium albocoremium*, *Penicillium alicantinum*, *Penicillium allii*, *Penicillium amagasakiense*, *Penicillium angulare*, *Penicillium antarcticum*, *Penicillium arenicola*, *Penicillium argillaceum*, *Penicillium asperosporum*, *Penicillium atramentosum*, *Penicillium atroveneretum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium aurantiovirens*, *Penicillium bialowiezense*, *Penicillium biforme*, *Penicillium bilaiae*, *Penicillium biourgeianum*, *Penicillium boreae*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium brevissimum*, *Penicillium brevistipitatum*, *Penicillium brocae*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium canariense*, *Penicillium canescens*, *Penicillium capsulatum*, *Penicillium carneum*, *Penicillium caseifulvum*, *Penicillium cavernicola*, *Penicillium cecidicola*, *Penicillium charlesii*, *Penicillium chermesinum*, *Penicillium chryso-*
60
65

ES 2 365 430 A1

Ejemplo 1

Identificación molecular de *Penicillium* sp.

5 Tras la elección del hongo *Penicillium* sp. como inductor de la actividad lacasa de *C. rigida*, se identificó la especie concreta mediante la secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS) de los genes de ARNr y comparación en las bases de datos Genbank. Para ello se prepararon matraces de 250 ml con 70 ml de medio glucosa y extracto de levadura y se inocularon mediante trozos de 0,5x0,5 cm de medio con el hongo a identificar. Estos cultivos se incubaron a 28°C durante 7 días. Tras el periodo de incubación, el cultivo se centrifugó y el micelio resultante se homogeneizó, lavó con DEPC y se mantuvo a -80°C hasta la extracción de ADN.

15 Para la extracción de ADN genómico, este micelio se congeló con nitrógeno líquido y se trituró hasta obtener un polvo fino en un mortero de porcelana. A partir de este homogeneizado se procedió a la extracción del ADN genómico mediante el kit *Genomix DNA extraction* (Talent, Italia) y se cuantificó la concentración de ADN obtenido mediante espectrofotometría. Este cálculo consiste en la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda de las muestras obtenidas, previamente diluidas 1:100 en agua milliQ estéril. La concentración de ácido nucleico se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 ng/ μ l de ADN de cadena doble. La pureza de la muestra se estimó mediante la relación de la absorbancia obtenida a 260 y 280 nm, teniendo en cuenta que cuanto más cercana al valor 1,8 es dicha relación, más alta es la pureza de la muestra de ADN obtenida.

20 Posteriormente se amplificó el ADN resultante mediante PCR utilizándose los cebadores degenerados correspondientes a las regiones ITS1 (SEQ ID NO:1) e ITS4 (SEQ ID NO:2) de hongos basidiomicetos descritos por White *et al.*, 1990, Academic Press, San Diego, USA).

25 Para la amplificación por PCR se usó un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) y se preparó la mezcla de reacción cuya composición fue: Tampón de amplificación de PCR 10x (Applied Biosystems) 5 μ l, MgCl₂ (Applied Biosystems) 1 mM, Cebador 5' 1 μ M, Cebador 3' 1 μ M, Desoxinucleósidos trifosfato (Promega) 50 μ M, ADNc molde 0,2 μ g, Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems) 1,2 U, en un volumen final de 50 μ l (completado con agua milliQ estéril) 50 μ l.

30 Los parámetros usados para la amplificación fueron: una etapa inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 min, seguidos de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales se desarrollaron a 94°C durante 30 s, luego 45°C durante 30 s, seguido de 72°C durante 2 min y, una etapa final de extensión de 72°C durante 10 min.

35 Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de agarosa y se extrajeron posteriormente mediante el kit de extracción Gene-clean, Q-BIOgene siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento aislado se insertó en el vector de clonación *pGEM-T Easy* (Promega) con el que se procedió a la transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . La ligación entre un fragmento de ADN y el vector de clonación adecuado se realizó usando una relación molar inserto:vector de 3:1. En la unión de fragmentos de ADN a plásmidos se utilizó la enzima ligasa del fago T4 (Promega) para la inserción del fragmento amplificado en el vector *pGEM-T Easy* (Promega). Se realizó la mezcla de reacción siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

45 La transformación se llevó a cabo por el método de choque térmico descrito por Sambrook y Russell, 2001, Vol. 1-3. 3rd Editorial Cold Spring Harbor. Laboratory Press USA. A las células competentes frías se les añadió 10 μ l de la suspensión del plásmido con el inserto ya ligado y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente se sometió a un choque térmico a 42°C durante 1 min para la apertura de poros en las células. A su término se enfrió de nuevo hasta 4°C durante 2 min. A estos cultivos celulares ya transformados se les añadió 800 μ l de medio LB líquido y se incubaron a 37°C durante 1 h.

50 Tras la incubación, se sembraron alícuotas de las células transformadas en placas Petri con medio LB con agar previamente preparadas con ampicilina, isopropilo-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 M y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido (X-gal) para la selección y visualización de las colonias bacterianas transformadas con plásmidos recombinantes. IPTG se usa para inducir la expresión del gen *LacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa en *E. coli*. La solución de IPTG se prepara a una concentración de 20 mg/ml, se esteriliza por filtración y se guarda a -20°C. Se añaden 100 μ l a la placa unos 30 min antes de sembrar. X-gal es un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa de modo que al ser hidrolizado forma precipitados azules. El X-gal se prepara en dimetilformamida a una concentración de 20 mg/ml. Se debe proteger de la luz debido a su fotosensibilidad y no es necesario filtrar. Se añaden a la placa 40 μ l a la placa unos 30 min antes de sembrar. En la selección se usan tanto el IPTG como el X-gal para diferenciar colonias recombinantes (blancas) de las no recombinantes (azules).

60 Las colonias seleccionadas se sembraron de nuevo en medio líquido LB y se incubaron durante 24 h a 37°C en agitación para el crecimiento de estas bacterias transformadas.

65 Tras la identificación del clon con el fragmento inserto se procedió a la purificación del ADN plasmídico mediante el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Finalmente, se procedió a la secuenciación de dicho fragmento para su posterior búsqueda BLAST (Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.) en la base de datos GenBank para la identificación del microorganismo objeto de estudio. La secuencia nucleotídica mostró un 100% de homología con la secuencia del espaciador transcrito interno del hongo *Penicillium commune* (Número de acceso DQ132843.1).

Ejemplo 2

Estudio de la actividad lacasa de C. rigida

5 Se cultivaron los hongos *C. rigida* y *P. commune* en matraces con 70 ml de medio MB (cuya composición es Glucosa a una concentración de 10 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ a una concentración de 2 g/l, H_2KPO_4 a una concentración de 1 g/l, MgSO_4 a una concentración de 0,5 g/l, Extracto de levadura a una concentración de 1 g/l, Peptona a una concentración de 5 g/l, y 1 ml/l de una mezcla de elementos trazas cuya composición es $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 100 mg/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 70 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 50 mg/l, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}_{10}$ a una concentración de 10 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 10 mg/l y $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 10 mg/l) tanto en monocultivo como en co-cultivo. En los hongos crecidos en co-cultivo se inoculó en primer lugar *C. rigida* y posteriormente *P. commune*, al mismo tiempo, a los 3 y a los 6 días de crecimiento de *C. rigida*.

15 Tras 12, 18 y 21 días de incubación a 28°C tanto de forma estacionaria como en agitación (80 rpm) los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y en el sobrenadante resultante se determinó la actividad lacasa. Para la determinación de la actividad lacasa se utilizó el método propuesto por Saparrat *et al.*, (2000) basado en la oxidación de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP) ó 2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) por parte de la lacasa, lo que produce un cambio de color.

20 Esta actividad se valoró midiendo la oxidación de dicho sustrato como el incremento lineal de la absorbancia en un espectrofotómetro a 469 nm ($\epsilon_{469}=27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La actividad se expresó en unidades internacionales por ml definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μmol de sustrato consumido por min.

25 El análisis de la producción de lacasa por el hongo *C. rigida* se realizó tanto en condiciones estáticas como de agitación. Los resultados muestran una mayor producción de actividad lacasa en condiciones estáticas, observándose cantidades 20 veces superiores a las de cultivos en agitación (Figura 1). Además, el incremento de actividad lacasa de *C. rigida* en condiciones estáticas se observó desde el inicio del cultivo fúngico. El pico de actividad lacasa del hongo se detectó a los 21 días de cultivo tanto en cultivos de *C. rigida* en condiciones estáticas como de agitación, con valores de 25 y 2 U/ml, respectivamente (Figura 1).

30 El co-cultivo estático de *C. rigida* y *P. commune* inoculados ambos hongos simultáneamente mostró menor actividad lacasa que el monocultivo de *C. rigida* (Figura 2A). Sin embargo, como se puede ver en la Figura 2B la inoculación de *P. commune* a cultivos de 3 días de *C. rigida* produjo un incremento significativo de la actividad lacasa de *C. rigida*. El efecto inductor de *P. commune* sobre la actividad lacasa de *C. rigida* se observó desde el inicio del cultivo aunque alcanzó un máximo a los 12 días de crecimiento del mismo (Figura 2B). Cabe destacar el efecto de la inoculación de *P. commune* a los 6 días de cultivo de *C. rigida* ya que, tras un periodo de crecimiento de 21 días, se detectaron valores de actividad lacasa de 60 U/ml. Podemos concluir que *P. commune* inoculado a cultivos estáticos de *C. rigida* de 6 días triplicó la producción de lacasa respecto al monocultivo de *C. rigida* cultivado en las mismas condiciones (Figura 2C).

35 Los valores de actividad lacasa de *C. rigida* detectados, tanto en mono como co-cultivo en agitación fueron muy inferiores a los obtenidos en condiciones estáticas, independientemente del tiempo de inoculación de *P. commune* respecto a *C. rigida* (Figura 2 y 3). En co-cultivos de *C. rigida* y *P. commune* inoculados de forma simultánea se obtuvo una inhibición de la producción de lacasa a tiempos de incubación mayores de 12 días mientras que cuando *P. commune* se inoculó a cultivos de *C. rigida* de 3 y 6 días, la actividad lacasa fue mayor que en los monocultivos de *C. rigida*. El mayor valor de actividad lacasa de *C. rigida* (4,7 U/ml) se detectó tras 12 días de crecimiento del co-cultivo con *P. commune*, inoculado tras 3 días de incubación (Figura 3).

50

Ejemplo 3

Producción de lacasa en medio basal en presencia de medio con fenoles como inductor

55

C. rigida se cultiva en 2% de medio de cultivo extracto de malta y se incuba en estufa a 28°C, tras su crecimiento se almacena a 4°C hasta su uso. El hongo se cultiva, posteriormente, en matraces de 250 ml con 70 ml de medio de cultivo basal con el 10% de mezcla fenólica. Tras la esterilización a 120°C durante 20 min, los medios se inoculan con 60 cuadrados 0.5 x 0.5 cm de medio MEA con el hongo, y se dejan crecer durante 21 días en régimen estático en una cámara de cultivo a 28°C.

65

ES 2 365 430 A1

TABLA 1

Composición del medio de extracto de malta

Medio extracto de malta (g/l)	
Extracto de Malta	6
Maltosa	1,8
Extracto de levadura	1,2
Glucosa	6
pH	4,7

TABLA 2

Composición del medio basal

Medio cultivo basal (g/l)	
Glucosa	10
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	2
H ₂ KPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
Extracto de levadura	1
Peptona	5
Elementos trazas	1
pH	5,1

TABLA 3

Composición del medio con mezcla fenólica

Medio con mezcla fenólica (g/l)	
Glucosa	10
(NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆	2
H ₂ KPO ₄	1
MgSO ₄	0,5
Extracto de levadura	1
Peptona	5
Elementos trazas	1
Polifenoles totales	0,9
pH	5,1

ES 2 365 430 A1

Transcurrido el período de incubación, se mide la actividad lacasa. Para la determinación de la actividad lacasa se utilizó el método basado en la oxidación de los sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP) ó 2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) por parte de la lacasa, lo que produce un cambio de color. Esta actividad se valoró midiendo la oxidación de dicho sustrato como el incremento lineal de la absorbancia en un espectrofotómetro a 469 nm ($\epsilon_{469}=27500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad se expresó en unidades internacionales por litro definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μmol de sustrato consumido por min. La mezcla de reacción por orden de aplicación contenía:

TABLA 4

Composición de la mezcla de reacción para la medida de la actividad lacasa

Composición	Concentración	μl
Tampón acetato sódico pH	200mM	500
Agua destilada		380
Muestra		20
Dimetoxifenol DMP	50mM	100

TABLA 5

Inducción de la actividad lacasa en C. rigida por mezcla fenólica

Medio de cultivo	Actividad lacasa UI/l	Actividad lacasa UI/l
Medio basal		18
Medio basal con mezcla fenólica		406

Ejemplo 4

Producción de lacasa en medio basal en presencia de Cu^{2+} como inductor

El inoculo de *C. rigida* se fabricó de manera similar que en el Ejemplo 3. El hongo se cultiva en matraces de 250 ml con 70 ml con de medio de cultivo basal al que se le añaden 75 mg/l de CuSO_4 . Se incuban durante 21 días y se determina la actividad lacasa de la misma forma que la descrita en el Ejemplo 3.

TABLA 6

Inducción de la actividad lacasa en C. rigida por Cu^{2+}

Medio de cultivo	Actividad lacasa UI/l
Medio basal	17
Medio basal con Cu^{2+}	25280

Ejemplo 5

Producción de lacasa en medio basal en presencia de P. commune como inductor

Se cultivaron los hongos *C. rigida* y *P. commune* en matraces con 70 ml de medio MB, a partir de los respectivos inóculos preparados igual que se describe en el Ejemplo 3. Se incuban durante 21 días y se determina la actividad lacasa de la misma forma que la descrita en el Ejemplo 3.

ES 2 365 430 A1

TABLA 7

Inducción de la actividad lacasa mediante co-cultivo de C. rigida con P. commune

Medio de cultivo	Actividad lacasa UI/l
Medio basal	19
Medio basal con <i>P. commune</i>	59950

Ejemplo 6

Purificación de la actividad lacasa de C. rigida en co-cultivo con P. commune

Para la purificación de la actividad lacasa se tomaron muestras de los sobrenadantes dializados y concentrados del mono y co-cultivo de *C. rigida* con la máxima actividad lacasa. Se utilizaron cultivos estáticos de *C. rigida* tras 21 días de crecimiento crecidos en monocultivo o en co-cultivo con *P. commune* tras 6 días de crecimiento de *C. rigida*. Con estas muestras se realizó una purificación de la actividad lacasa mediante isoelectroenfoque y cromatografía. El isoelectroenfoque se realizó mediante un zimograma de cada una de las muestras. Para la separación de los perfiles de isoenzimas de actividad lacasa por punto isoelectrónico el medio de cultivo de *C. rigida* dializado y concentrado se sometió a análisis por isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida al 5% con un grosor de 1 mm y gradiente de pH de 3-10 (Bio-Rad Ampholine). El volumen de muestra aplicado se añadió en base a la actividad enzimática (5 ml). Las soluciones del ánodo y el cátodo utilizadas fueron: H_3PO_4 1 M e NaOH 1 M, respectivamente. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una cubeta Protean IEF Celi (Bio-Rad) a un voltaje constante de 1000 V durante 1 h 30 min aproximadamente. Tras finalizar el proceso se determinó el gradiente de pH mediante un electrodo de contacto a lo largo del gel.

Una vez terminado el isoelectroenfoque el gel se incubó durante 10 min en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. La visualización de las bandas de proteínas con actividad lacasa se realizó sumergiendo el gel en una solución de 5 mM de DMP disuelta en el mismo tampón, y se mantuvo en agitación hasta la aparición de bandas de actividad como consecuencia del precipitado del producto de la reacción (cerulignona).

En el siguiente paso de la purificación se realizaron dos separaciones cromatográficas. Inicialmente se realizó una cromatografía de exclusión molecular para lo cual se utilizó una columna Superdex 200 16/60 de alta resolución (Amersham Pharmacia Biotech) acoplada a un equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Mediante esta técnica cromatográfica las moléculas de la muestra se separan en solución según su peso molecular o tamaño debido a la red tridimensional porosa que posee la columna. Se utilizó tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,1 con 150 mM de NaCl como fase móvil para eliminar posibles interacciones entre la proteína y la matriz de la columna. Se aplicó una muestra de 1 ml y se eluyó a un flujo de 0,4 ml/min. Una vez eluida la muestra se determinó la actividad lacasa con DMP como sustrato a las fracciones de mayor absorbancia a 280 nm. El pico recogido de mayor actividad lacasa se conservó a 4°C con un 10% (p/v) de glicerol para su posterior utilización. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo utilizando el software UNICORN (Amersham Biosciences). En esta separación cromatográfica se añadieron como patrones de calibración una mezcla de marcadores de bajo peso molecular (Gel Filtration LMW Calibration kit, Amersham Pharmacia Biosciences).

Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución. En este caso se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences) acoplada al equipo AKTApurifier (Amersham Biosciences). Tras equilibrar la columna con tampón acetato sódico 10 mM pH 5, se aplicó la muestra de 2 ml previamente concentrada por ultrafiltración (Microsep, 3 kDa de tamaño de poro, Pall Filtran) y dializada con tampón acetato sódico 10 mM pH 5 a través de una columna Pd10 (Amersham Biosciences). Posteriormente se lavó la columna con el mismo tampón hasta que se estabilizó la absorbancia a 280 nm. La fracción retenida se eluyó con un gradiente de tampón acetato sódico 10 mM con NaCl 1 M, pH 5 de 0 a 25% en 42 min, y de 25 a 100% en 5 min. El flujo de elución utilizado fue de 0,8 ml/min y se recogieron fracciones de 2 ml. Tras la cromatografía, a los picos de mayor absorbancia a 280 nm se les analizó la actividad lacasa con DMP como sustrato. Los picos recogidos de mayor actividad lacasa se conservaron a 4°C con un 10% (p/v) de glicerol para su posterior utilización. El análisis de los cromatogramas se llevó a cabo utilizando el software UNICORN (Amersham Biosciences).

ES 2 365 430 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Coriolopsis* que comprende co-cultivar dicho organismo junto con otro organismo del género *Penicillium*.
2. Método según la reivindicación 1 que comprende los pasos:
- 10 a) cultivar un organismo del género *Coriolopsis*
- b) añadir al cultivo del paso (a) un organismo del género *Penicillium*, y
- c) co-cultivar ambos organismos.
- 15 3. Método según la reivindicación 2 donde el organismo del paso (b) se añade 3 días después de iniciar el cultivo del paso (a).
4. Método según la reivindicación 2 donde el organismo del paso (b) se añade 6 días después de iniciar el cultivo del paso (a).
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 donde el co-cultivo se realiza en condiciones estáticas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde el co-cultivo se realiza durante al menos 12 días.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde el co-cultivo se realiza durante al menos 18 días.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 donde el co-cultivo se realiza durante al menos 21 días.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 donde el método comprende un paso adicional d) que consiste en la purificación de la lacasa.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el organismo del género *Coriolopsis* se selecciona de la lista que comprende: *Coriolopsis aspera*, *Coriolopsis byrsina*, *Coriolopsis caperata*, *Coriolopsis gallica*, *Coriolopsis polyzona*, *Coriolopsis rigida* o *Coriolopsis sanguinaria*.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el organismo del género *Coriolopsis* es *Coriolopsis rigida*.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el organismo del género *Penicillium* es *Penicillium commune*.

45

50

55

60

65

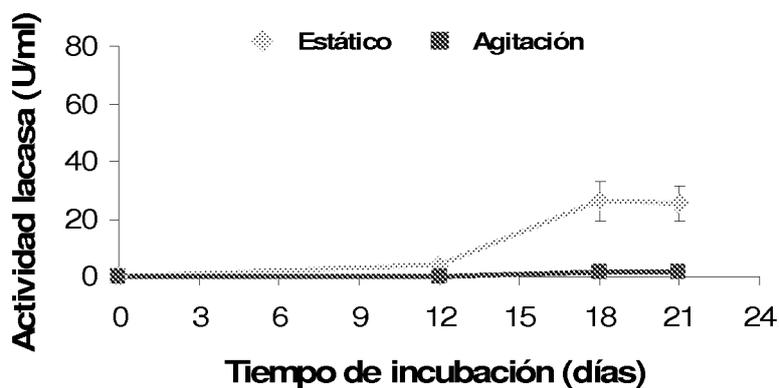


FIG. 1

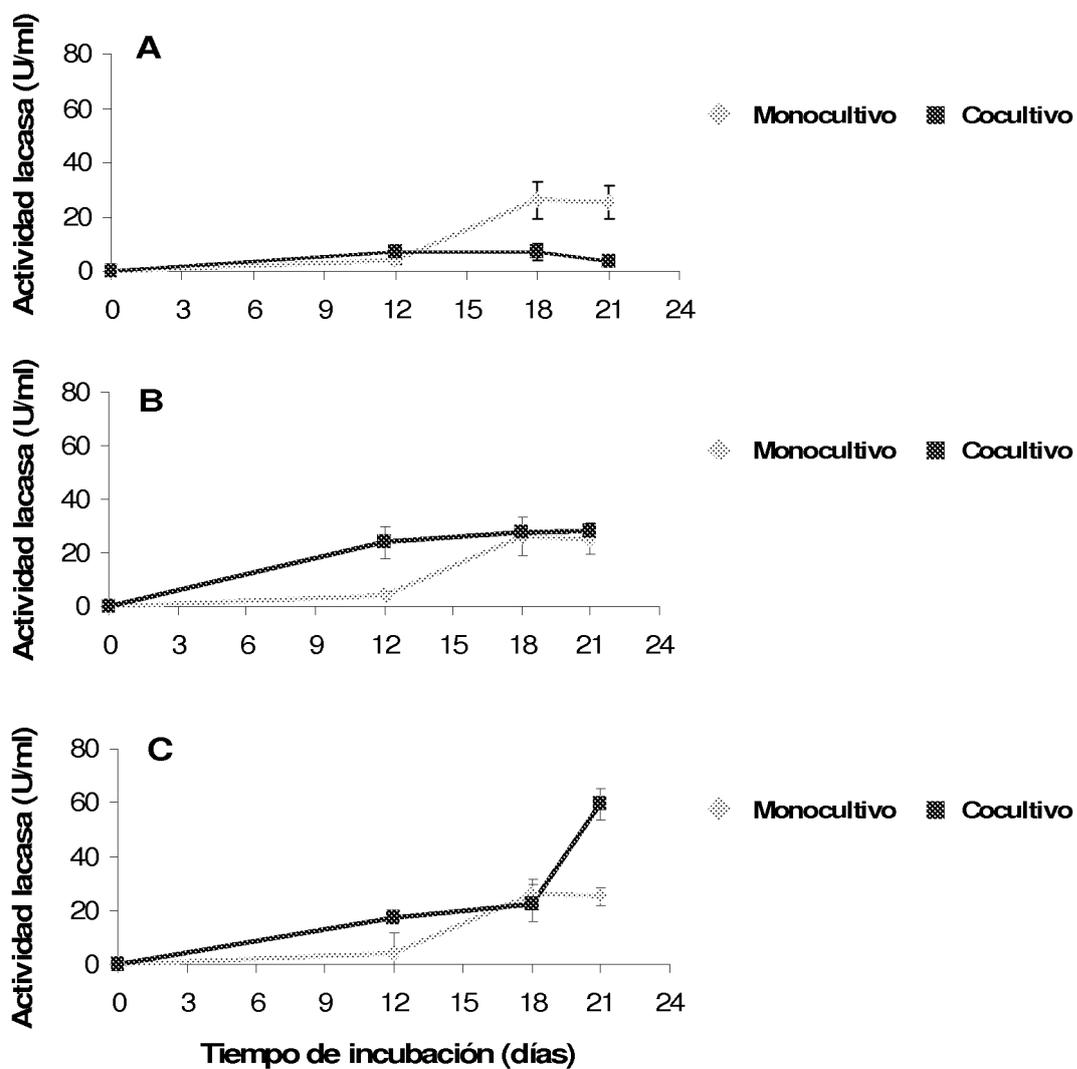


FIG. 2

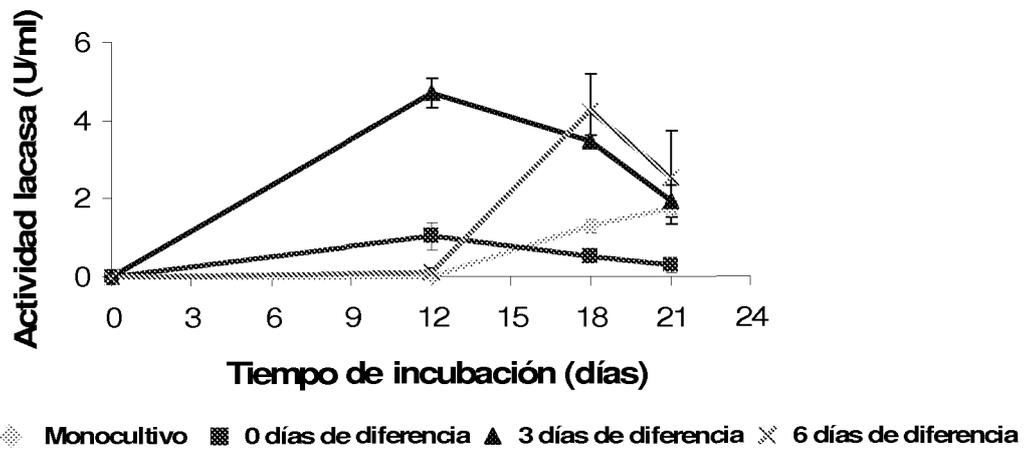


FIG. 3

ES 2 365 430 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)	
5	<120> Método para el incremento de la producción de lacasa en <i>Coriolopsis</i> mediante un inductor biológico	
	<130> ES1641.701	
10	<160> 2	
	<170> PatentIn version 3.5	
15	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> Cebador ITS1	
25	<400> 1	
	tccgtagtg aacctgcg	18
30	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> Cebador ITS4	
40	<400> 2	
	tcctccgctt atgatatgc	20
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030417

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.03.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/02** (01.01.2006)
C12N1/14 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	V. KOVAC "Effect des moisures du genre <i>Penicillium</i> sur l'activité laccase du <i>Botrytis cinerea</i> " ANN. TECHNOL. AGRIC. vol. 28 no. 3, 1979, páginas 345-355. Página 348 y Tabla 2.	1-12
A	HAMED M. EL-SHORA et al. "Inducers and inhibitors of laccase from <i>Penicillium</i> " BIOTECHNOLOGY vol. 7 no. 1, 2008, páginas 35-42. Resumen, página 40, apartado: discussion.	1-12
A	PETR BALDRIAN "Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi" FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY vol. 50, 2004, páginas 245-253. Páginas 251, apartado 3.4; tablas 1 y 2.	1-12
A	JOSE GOMEZ et al. "Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by <i>Corioloopsis rigida</i> under solid-state conditions". JOURNAL OF FOOD ENGINEERING vol. 68, 2005, páginas 315-319. Página 316, columna izquierda, párrafo cuarto; página 317, apartado 3.1.	1-12
A	H. ZHANG et al. "Efficient production of laccases by <i>Trametes sp.</i> AH28-2 in cocultivation with a <i>Trichoderma</i> strain" APPL MICROBIOL BIOTECHNOL vol. 73, 2006, 89-94. Resumen, páginas 90-91 y página 93, apartado discussion.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.03.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NLP, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	V. KOVAC "Effect des moisures du genre <i>Penicillium</i> sur l'activité laccase du <i>Botrytis cinerea</i> " ANN. TECHNOL. AGRIC. vol. 28 no. 3, 1979, páginas 345-355. Página 348 y Tabla 2.	
D02	HAMED M. EL-SHORA et al. "Inducers and inhibitors of laccase from <i>Penicillium</i> " BIOTECHNOLOGY vol. 7 no. 1, 2008, páginas 35-42. Resumen, página 40, apartado: discussion.	
D03	PETR BALDRIAN "Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi" FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY vol. 50, 2004, páginas 245-253. Páginas 251, apartado 3.4; tablas 1 y 2.	
D04	JOSE GOMEZ et al. "Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by <i>Corioloopsis rigida</i> under solid-state conditions". JOURNAL OF FOOD ENGINEERING vol. 68, 2005, páginas 315-319. Página 316, columna izquierda, párrafo cuarto; página 317, apartado 3.1.	
D05	H. ZHANG et al. "Efficient production of laccases by <i>Trametes sp.</i> AH28-2 in cocultivation with a <i>Trichoderma</i> strain" APPL MICROBIOL BIOTECHNOL vol. 73, 2006, 89-94. Resumen, páginas 90-91 y página 93, apartado discussion.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un método para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Corioloopsis* que comprende co-cultivar dicho organismo junto con otro organismo del género *Penicillium* (reivindicación 1). Dicho método comprende los pasos de a) cultivar un organismo del género *Corioloopsis*, b) añadir al cultivo del paso a) un organismo del género *Penicillium* y c) co-cultivar ambos organismos (reivindicaciones 2-9). El organismo del género *Corioloopsis* es *Corioloopsis rigida* (reivindicaciones 10-11) y el organismo del género *Penicillium* es *Penicillium commune*.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 se refiere a la influencia que ejercen ciertas especies de *Penicillium* sobre la síntesis de lacasa a partir de *Botrytis cinerea*. Se muestra en dicho documento que el aumento de la actividad oxidativa (es decir, un aumento de la actividad de lacasa) de un cultivo de *Botrytis cinerea* es debido a la acción ejercida por organismos del género *Penicillium* sobre *B. cinerea*. El estudio se llevó a cabo con diferentes especies de *Penicillium* para ver cuál era la síntesis de lacasa por *B. cinerea* cuando se encontraba en presencia de dichas especies (véase página 348, apartado "Influence de certaines espèces de *Penicillium* sur la synthèse de la laccase de *Botrytis cinerea*" y Tabla 2).

El documento D02 describe el efecto que produce la interacción de diferentes microorganismos con hongos de pudredumbre blanca (write-rot fungi) sobre la actividad de la lacasa. Para ello, se mezclaron cultivos de *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* con otros microorganismos. Entre estos otros microorganismos utilizados se encuentran *Penicillium rugulosum* y *Corioloopsis occidentalis* (véase Tabla 1 y Tabla 2). La actividad de la lacasa en cultivos mezclados fue de 2 a 25 veces mayor que en cultivos individuales dependiendo de la especie (véase página 251, párrafo 3.4).

El documento D03 trata del estudio de desechos de alimentos que podrían usarse como sustratos para la producción de lacasa a partir de *Corioloopsis rigida*. Los desechos evaluados fueron cáscaras de castaña y salvado de cebada (véase página 316, columna izquierda, párrafo cuarto). Los niveles de lacasa fueron mayores en el salvado de cebada que en las cáscaras de castaña (véase resumen) y se obtuvo una mayor producción de lacasa cuando los cultivos tanto de cáscara de castaña como de salvado de cebada se suplementaron con sulfato de cobre (véase página 317, apartado 3.1).

El documento D04 hace referencia a inductores e inhibidores de la producción de lacasa a partir de los organismos *Penicillium aculeatum*, *P. digitatum* y *P. cyclopium*. El objetivo de dicho documento es mejorar la producción de lacasa a partir de los organismos citados anteriormente. La producción de lacasa a partir de los tres organismos de *Penicillium* se indujo con guaicol, ácido caféico, siringaldacina y ácido sinapínico. Y se vio que el ácido sinapínico era el inductor más eficiente de la biosíntesis de lacasa (véase resumen y página 40, apartado: discussion).

El documento D05 trata sobre la producción eficiente de lacasa por *Trametes sp.* en co-cultivo con *Trichoderma sp.* (véase resumen y páginas 90-91). Se produce un alto rendimiento de lacasa en co-cultivos de *Trametes sp.* AH28-2 y *Trichoderma sp.* ZH1, el cual es aproximadamente idéntico a los inducidos por compuestos aromáticos tales como o-toluidina y lingnina kraft que son unos de los inductores más eficaces hasta ahora ensayados (véase página 93, apartado: discussion).

Por lo tanto, en ninguno de los documentos citados anteriormente aparece un método para la producción incrementada de lacasa en un organismo del género *Coriolopsis* que comprende co-cultivar dicho organismo junto con otro organismo del género *Penicillium*. Ni tampoco existe ninguna evidencia en dichos documentos, solos o en combinación, que dirija al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-12. Por lo que se considera, que las reivindicaciones 1-12 de la presente solicitud de patente cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.